

中央実験施設

中央実験施設

<研究スタッフ>

施設長（併） 松本 邦夫

准教授 黒木 和之

准教授 久野 耕嗣

技術補佐員 久保 周子（～H25.11）

准教授 遠藤 良夫

技術補佐員 志村 瞳（H25.12～）

【研究概要】

中央実験施設では、がん研究所共同利用施設および中央研究室の運営に携わると共に、黒木はB型肝炎ウイルス感染の分子メカニズムの解明、遠藤はがんの光線力学的療法の新たな応用研究を中心に、久野は遺伝子欠損マウスを用いたADAMTS1の雌生殖機能における役割とその生理活性の解析をテーマに研究を進めている。

<2013年の研究成果、進行状況と今後の計画>

B型肝炎ウイルスの増殖と感染の分子機構（黒木）

肝炎、肝がん発生の原因ウイルスであるB型肝炎ウイルスのLife cycleを理解することは、このウイルスの感染・増殖を阻止する新たな方策を探る上で大切である。HBV感染の分子メカニズム解明のため、ツールとしての新規HBVベクターの構築とHBV感染培養細胞系の樹立を進めている。本年はより安全なHBV感染と迅速・簡便な検出のため、自立的な増殖能を欠損し、かつ、感染成立の指標となる各種マーカー遺伝子を組み込んだ組換えHBVベクターを構築し、これらを新しくデザインしたHepG2, HEK293由来パッケージング細胞へ導入することにより培養液中に組換えHBV粒子の産生に成功した。一方、HBVレセプターとして昨年報告されたNTCPの発現は感染効率を上げること、また、iPS細胞Dotcomより分化誘導した肝細胞に組換えHBVが感染することを示した。今後、未成熟HBV粒子が多く産生される現状の改善とより感染効率の良いin vitro感染系の樹立を試みるとともに、HBV感染初期過程に関わる宿主因子の同定と感染メカニズムの解明およびHBV感染・増殖を阻止する化合物の探索と創薬を目標に研究を進める。

5-ALAを用いる光線力学的療法の新たな応用（遠藤）

光感受性物質と光線を用いる光線力学的治療（PDT）は低侵襲性のがん治療法の一つとして知られる。5-アミノレブリン酸（以下ALA）は、従来のPDTで用いられてきたポルフィリン関連化合物とは異なり、腫瘍細胞内でヘム生合成経路の酵素群によりプロトポルフィリンIX（PpIX）に代謝され、光感受性物質として活性化される。がん細胞内でPpIXが

蓄積した後に、630 nm付近の赤色励起光を照射すると大量の一重項酸素が生じ、殺細胞効果が発揮される (ALA-PDT)。また、PpIXは405-410 nm付近の青色光により赤色蛍光を発するため、がん組織が可視化され、術中診断が可能となる (ALA-PDD)。本邦においては膀胱がんや脳腫瘍の蛍光診断に使用されている。今年度のヒト胃癌細胞MKN-45より樹立したALA-PDTに対する獲得耐性細胞の耐性化機構に関する研究では、PEPT1とABCG2を含む複数のアミノ酸トランスポーターやABCトランスポーターの発現が変化している以外にも、ヘムの分解酵素であるheme oxygenase (decycling) 1やbilirubinの細胞外排出に関わるトランスポーターの発現が亢進していることが明らかになった。また、低分子化合物ライブラリーを用いてALA-PDTに対する感受性増強剤のスクリーニングを実施し、ALAと同時処理をすることでPDT効果を相乗的に増強することができる化合物を見出した。

〈今後の計画〉ALA-PDTに対する感受性増強剤の誘導体展開を実施し、多様ながん腫の診断や治療に広く応用可能な新薬シーズの開発を目指す。

ADAMTS-1 の雌生殖機能における役割の解析 (久野)

ADAMTS-1^{-/-}マウス (129/B6 遺伝子背景) は、腎盂尿管移行部閉塞症と酷似した表現型を示し、排卵過程、卵胞生育過程、卵巢髄質部の血管形成、皮膚損傷治癒過程などにも異常を示すが、その後 BALB/c 遺伝子背景の ADAMTS-1^{-/-}マウスでは分娩異常が高頻度で起こることを見出している。また ADAMTS-1^{-/-}マウスの子宮平滑筋では、オキシトシン、PGF₂、 μ PGF₂ 等に対する収縮応答性が低下していることを見い出している。今回、ADAMTS-1^{-/-}マウスの分娩異常の原因を明らかにするため、分娩前子宮組織における、uterotonin 受容体等、子宮収縮調節に関わる遺伝子群の発現を調べた。その結果、妊娠 19 日目の分娩前子宮組織においては、EP₁ および EP₃ 受容体の mRNA 発現量は、ADAMTS-1^{-/-} および野生型マウスの間で有意な差は認められなかったが、FP 受容体の mRNA 量は、野生型マウスと比較して ADAMTS-1^{-/-}マウスで軽度の低下が認められた。また分娩前の ADAMTS-1^{-/-}の子宮組織では、オキシトシン受容体遺伝子だけでなく gap junction 構成タンパクである Connexin43 遺伝子の mRNA 発現量もコントロール群と比較して有意に減少していることがわかった。これらの結果から ADAMTS-1 は、分娩前に Connexin43、オキシトシン受容体、FP 受容体などの収縮調節遺伝子群が発現誘導されて uterotonin への収縮応答性や筋収縮性が増大する過程に必要である可能性が示唆された。今後、ADAMTS-1^{-/-}マウスの子宮組織における他の子宮収縮調節因子や ECM 構成成分の変化と組織学的変化の解析、また子宮頸管熟化過程について解析を行い、ADAMTS-1 の分娩過程全般における役割を明らかにする。

【 研 究 業 績 】

<発表論文>

(共同研究)

1. Kuchiike D, Uto Y, Mukai H, Ishiyama N, Abe C, Tanaka D, Kawai T, Kubo K, Mette M, Inui T, Endo Y, Hori H: Degalactosylated/desialylated human serum containing GcMAF induces macrophage phagocytic activity and in vivo antitumor activity. *Anticancer Res.* 2013 Jul;33(7):2881-5.
2. Hagiya Y, Fukuhara H, Matsumoto K, Endo Y, Nakajima M, Tanaka T, Okura I, Kurabayashi A, Furihata M, Inoue K, Shuin T, Ogura S: Expression levels of PEPT1 and ABCG2 playkey roles in 5-aminolevulinic acid(ALA)-induced tumor-specificprotoporphyrin IX (PpIX) accumulation inbladder cancer. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2013 Sep;10(3):288-95. doi: 10.1016/j.pdpdt.2013.02.001. Epub 2013 Mar 15.
3. Canbay E, Ishibashi H, Sako S, Kitai T, Nishino E, Hirano M, Mizumoto A, Endo Y, Ogura SI, Yonemura Y: Photodynamic detection and management of intraperitoneal spreading of primary peritoneal papillary serous carcinoma in a man: report of a case. *Surg Today.* 2013 Feb 23. DOI 10.1007/s00595-013-0500-1 [Epub ahead of print]
4. Kitano A, Shimasaki T, Chikano Y, Nakada M, Hirose M, Higashi T, Ishigaki Y, Endo Y, Takino T, Sato H, Sai Y, Miyamoto K, Motoo Y, Kawakami K, Minamoto T: Aberrant glycogen synthase kinase 3 β is involved in pancreatic cancer cell invasion and resistance to therapy. *PLoS One.* 2013;8(2):e55289. doi: 10.1371/journal.pone.0055289. Epub 2013 Feb 8.

<学会発表>

1. 黒木和之, 久保周子:HBV ベクターの構築 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2013 年 11 月 10 日～12 日 (神戸, 神戸国際会議場)
2. 宇都義浩, 玉谷 大, 河井智仁, 遠藤良夫, 大久保敬, 中西郁夫, 石塚昌宏, 田中 徹, 口池大輔, 久保健太郎, 乾 利夫, 堀 均: 発育鶏卵を用いた 5-aminolevulinic acid および Tin Chlorin e6 の超音波増感活性と薬物動態の評価 第 17 回バイオ治療法研究会 2013 年 12 月 7 日 (土) (福岡, 福岡大学病院 福大メディカルホール)
3. Y. Uto, R. Takeuchi, Y. Nakagawa, K. Hirota, H. Terada, S. Onizuka, K. Kubo, D. Kuchiike, M. Mette, T. Inui, Y. Endo and H. Hori: Development of Immunomodulatory Cancer Therapy Based on Gc protein-derived Macrophage Activating Factor (GcMAF) 7th International

Symposium on Nanomedicine (ISNM2013) 2013年11月7日（木）～9日（土）（北九州，百周年中村記念館）

4. Yoshihiro Uto, Yoshio Endo, Hiroshi Sato, Hitoshi Hori Development of antimetastatic hypoxic cytotoxin TX-2137 targeting for Akt/protein kinase B 第72回日本癌学会学術総会 2013年10月3日（木）-5日（土）（横浜，パシフィコ横浜）
5. Yoshio Endo, Shun-ichiro Ogura, Yutaka Yonemura, Kimura Masashi: Enhanced effect of ALA-PDT using dipyridamole 第72回日本癌学会学術総会 2013年10月3日（木）-5日（土）（横浜，パシフィコ横浜）
6. 原 毅弘，宇都義浩，中島綾香，福島孝士朗，野口智帆，遠藤良夫，前澤 博，富永正英，福本修一，堀 均：発育鶏卵を用いたオオバギ葉抽出物の放射線防護活性の評価 第19回癌治療増感研究会 2013年6月8日（土）（東京，東京医科歯科大学歯科棟南4F歯学部特別講堂）
7. 宇都義浩，玉谷 大，遠藤良夫，石塚昌宏，田中 徹，堀 均：発育鶏卵を用いた5-ALAの超音波増感活性の評価 第3回ポルフィリン-ALA学会年会 2013年4月27日（横浜，東京工業大学 すすかけ台キャンパス すすかけホール）
8. 遠藤 良夫，小倉 俊一郎，米村 豊：5-ALAを用いるがんの光線力学的療法における耐性化機序の解析 日本薬学会第133年会 2013年3月30日（横浜，パシフィコ横浜）
9. 野口智帆，宇都義浩，福島孝志朗，田中大地，遠藤良夫，前澤 博，福本修一，堀均：発育鶏卵を用いた放射線防護活性の評価系の構築 日本薬学会第133年会 2013年3月30日（横浜，パシフィコ横浜）
10. 宇都義浩，遠藤良夫，久保健太郎，乾 利夫，堀 均：発育鶏卵を工学的動物モデルとした制がん剤のメディシナルケミストリー 日本化学会第93春季年会 2013年3月22日（金）～25日（月）（立命館大学びわこ・くさつキャンパス）
11. 宇都義浩，皆巳和賢，原田 浩，遠藤良夫，前澤 博，増永慎一郎，堀 均：解糖系からみた癌増感のターゲット：糖修飾放射線増感剤のメディシナルケミストリー 第15回癌治療増感研究シンポジウム 2013年2月9日-10日（奈良，猿沢荘）
12. 生水真紀夫，多久和陽，岡本安雄，栗原裕基，松島綱治，久野耕嗣（[○]発表者）ADAMTS-1の分娩過程における役割の解析 第36回日本分子生物学会年会 2013年12月3日～6日（神戸，神戸ポートアイランド）

<外部資金>

1. 厚生労働科学研究費補助金 B型肝炎創薬実用化等研究事業 分担：黒木和之
直接経費：10,000千円

2. 科学研究費補助金（基盤研究C）代表：遠藤良夫
直接経費：1,200千円
3. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 分担：遠藤良夫
直接経費：600千円
4. 産学官連携共同研究（平成25年5月～平成26年3月1件）代表：遠藤良夫
直接経費：762千円

<共同研究>

1. HBV エンベロープタンパク質と相互作用する細胞膜表面分子の網羅的探索 （大阪大学大学院医学系研究科ウイルス学）（黒木和之）
2. 5-ALA を用いた転移性胃癌の術中診断および治療法の開発（東工大・フロンティア研究機構，徳島大・ソシオテクノサイエンス研究部，NPO 腹膜播種治療支援機構）（遠藤良夫）
3. アミノレブリン酸投与後の腫瘍特異的ポルフィリン蓄積メカニズムの細胞レベルでの解明（東工大・フロンティア研究機構）（遠藤良夫）
4. 受精鶏卵を用いる放射線増感剤感受性試験の確立
ヒトがん細胞を用いた MMP-9 阻害性抗転移剤の開発（徳島大・ソシオテクノサイエンス研究部）（遠藤良夫）
5. 腹膜偽粘液腫の本邦における発生頻度・病態の解明・治療法の開発（NPO 腹膜播種治療支援機構）（遠藤良夫）